



(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift

(10) DE 43 27 226 A 1

(51) Int. Cl. 6:

C 07 H 13/04

A 61 K 31/70

DE 43 27 226 A 1

(21) Aktenzeichen: P 43 27 226.6  
 (22) Anmeldetag: 13. 8. 93  
 (43) Offenlegungstag: 16. 2. 95

(71) Anmelder:

Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

(72) Erfinder:

Vertesy, László, Dr., 65817 Eppstein, DE; Aretz,  
 Werner, Dr., 61462 Königstein, DE; Fehlhaber,  
 Hans-Wolfram, Dr., 65510 Idstein, DE

THE BRITISH LIBRARY  
 10 MAR 1995  
 SCIENCE REFERENCE AND  
 INFORMATION SERVICE

(54) Chelatoren, ihre Herstellung aus den Antibiotika Salmycin A, B oder C und deren Verwendung

(55) Aus den Antibiotika Salmycin A, B und C, die durch Fermentation gewonnen werden, werden die neuen Stoffe Nordanoxamin, Desferri-Nordanoxamin, Desferri-Salmycin A, B und C und die bekannten Stoffe Danoxamin und Desferri-Danoxamin hergestellt. Die Stoffe werden als Chelatoren und Arzneimittel verwendet.

DE 43 27 226 A 1

English Abstract for DE 43 27 226

2/PN, TI, AU, AB/1  
DIALOG(R) File 351: (c) 2002 Thomson Derwent. All rts. reserv.

New iron chelate and desferri derivs. derived from Salmycin cpds. - and danoxamin, useful in treatment of Alzheimer's disease and haemochromatosis

Inventor: ARETZ W; FEHLHABER H; VERTESY L

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 4327226	A1	19950216	DE 4327226	A	19930813	199512 B
EP 640615	A1	19950301	EP 94112384	A	19940808	199513
JP 7053584	A	19950228	JP 94189726	A	19940812	199517
US 5519123	A	19960521	US 94286452	A	19940805	199626

Abstract (Basic): DE 4327226 A

The following cpds. are new. (a) nordanoxamine (Ia), mol. wt. 658 g/mol., molecular formula C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>FeN<sub>5</sub>O<sub>11</sub>; (b) desferri-nordanoxamine (Ib), mol. wt. 605g/mol., mol. formula C<sub>26</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>; (c) desferri-salmycin A (IIa), mol. wt. 1000g/mol., mol. formula C<sub>41</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>21</sub>; (d) desferri-salmycin B (IIb), mol. wt. 985 g/mol., mol. formula C<sub>41</sub>H<sub>72</sub>N<sub>6</sub>O<sub>21</sub>; and (e) desferri-salmycin C, mol. wt. 971 g/mol., mol. formula C<sub>40</sub>H<sub>72</sub>N<sub>6</sub>O<sub>21</sub>. Also claimed are (A) prepn. of danoxamine (IIIa) (mol. formula C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>FeN<sub>4</sub>O<sub>11</sub>; mol. wt. 672g/mol.) comprising hydrolysis of (IIa) and/or (IIb); and (B) prepn. of desferri-danoxamine (IIIb) comprising (a) redn. of (IIa) and/or (IIb) by hydrolysis and treatment with a complexing or iron-binding agent, or redn. of the bound Fe<sup>3+</sup> ions.

USE - The des-ferri cpds. ((Ib), (IIIb), (IIa), (IIb) and (IIc)) are useful as chelating agents, esp. for binding Fe<sup>3+</sup> and Al<sup>3+</sup>, and in the treatment of haemochromatosis or Alzheimer's disease (claimed). Admin. is esp. oral or parenteral.

ADVANTAGE - Process (A) allows prodn. of (IIIa) (see Helv. Chim. Acta 69, 236-245 (1986)), a known iron chelate cpd., in larger amts. than are possible using prior art processes.

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): US 5519123 A

A compound, termed nordanoxamine, having the empirical formula C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>FeN<sub>5</sub>O<sub>11</sub> and a molecular weight of 648 g/mol, or an iron-free form thereof, termed desferrinordanoxamine, having the empirical formula C<sub>26</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub> and a molecular weight of 605 g/mol; a compound, termed desferrisalmycin A, of the empirical formula C<sub>41</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>21</sub> and of a molecular weight of 1000 g/mol; a compound, termed desferrisalmycin B, of the empirical formula C<sub>41</sub>H<sub>72</sub>N<sub>6</sub>O<sub>21</sub> and of a molecular weight of 985 g/mol; a compound, termed desferrisalmycin C, of the empirical formula C<sub>40</sub>H<sub>70</sub>N<sub>6</sub>O<sub>21</sub> and of a molecular weight of 971 g/mol; and a compound, termed desferrisalmycin D, of the empirical formula C<sub>40</sub>H<sub>71</sub>N<sub>7</sub>O<sub>21</sub> and of a molecular weight of 986 g/mol.

Dwg.0/0

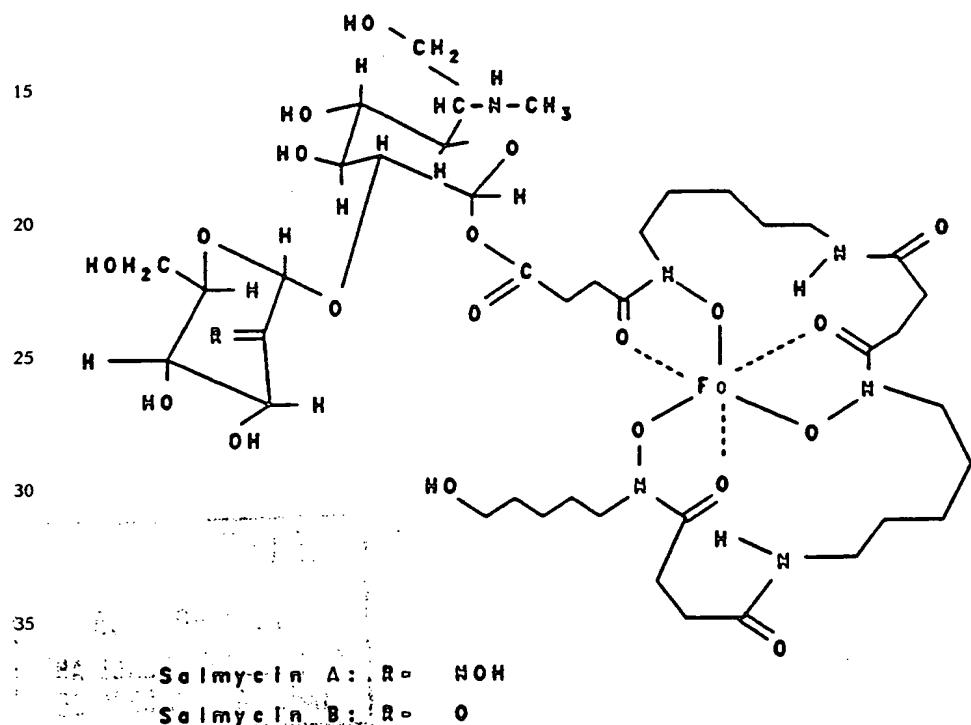
?

## Beschreibung

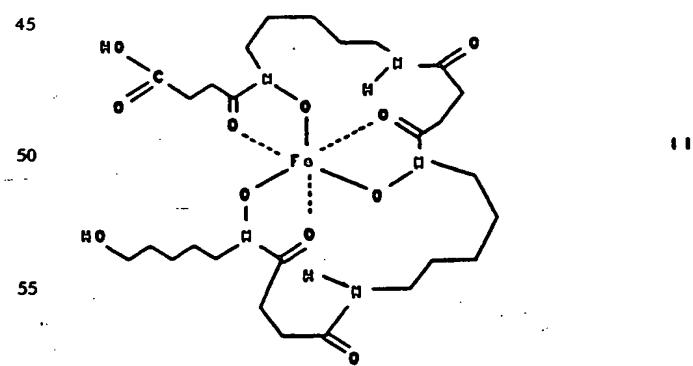
Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Chelatoren, deren Herstellung aus den Salmycinen A, B oder C und ihre Verwendung als Arzneimittel.

5 Salmycine können durch Fermentation mit Hilfe des Mikroorganismus *Streptomyces violaceus* 37290 (DSM 8286) gewonnen werden (Patent Anmeldung: L. Vertes et al., "Antibiotics, called Salmycin A, B and C, a process for their preparation and their use as a pharmaceutical", Hoechst AG).

10 Die Salmycine sind eisenhaltige Antibiotika, sogenannte Sideromycine, die aus einer Chelat- und einer Amino-Disaccharid-Komponente bestehen. Die vermuteten Strukturen von Salmycin A und B werden durch Formel I dargestellt. Die Struktur von Salmycin C ist noch nicht völlig aufgeklärt.



40 Aus Salmycin A und B wird durch Hydrolyse das bereits bekannte Eisenchelat Danoxamin (P. Huber et al., Helv. Chim. Acta 69 (1986) 236–245) hergestellt. Danoxamin hat die Summenformel  $C_{27}H_{46}FeN_5O_{11}$  und ein Molekulargewicht von 672 g/mol. Formel II zeigt die Struktur von Danoxamin.



60 Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß aus Salmycin C das bisher nicht beschriebene Eisenchelat Nordanoxamin gewonnen werden kann.

Erfindungsgegenstand ist demzufolge die Verbindung mit der Summenformel  $C_{26}H_{44}FeN_5O_{11}$  mit einem Molekulargewicht von 658 g/mol, genannt Nordanoxamin, sowie dessen eisenfreie Form mit der Summenformel  $C_{26}H_{47}N_5O_{11}$  und einem Molekulargewicht 605 g/mol, genannt Desferri-Nordanoxamin.

65 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die eisenfreien Verbindungen Desferri-Salmycin A, B und C.

Weiterhin gehört zum Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von Danoxamin und Nordanoxamin durch Hydrolyse von Salmycin A, B und/oder C.

Die Salmycine stammen vorzugsweise aus einem fermentativen Prozeß mit dem Mikroorganismus *Streptomyces violaceus* (DSM Nr. 8286) wie in der Patentanmeldung von L. Vertesy et al., "Antibiotics, called Salmycin A, B and C, a process for their preparation and their use as a pharmaceutical" beschrieben ist. Die Hydrolyse der Salmycine sollte unter milden Bedingungen ausgeführt werden und kann in verdünnter Lauge, z. B. Ammoniumhydroxidlösung, bei Raumtemperatur erfolgen, vorzugsweise bei pH 9,5. im allgemeinen ist die Hydrolyse der Salmycine nach 2 Stunden weitgehend abgeschlossen. Es ist vorteilhaft, die Reaktionslösung für die weitere Aufarbeitung zu neutralisieren. Das enthaltene Danoxamin oder Nordanoxamin kann durch chromatographische Methoden, insbesondere Umkehrphasen-Chromatographie, z. B. mit C<sub>18</sub>-Kieselgel als Trägermaterial und einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril als Fließmittel, vorzugsweise einem Konzentrationsgradienten von 0—15 Vol.-% Acetonitril, abgetrennt und gereinigt werden.

Die Herstellung von Danoxamin, Nordanoxamin und deren eisenfreien Formen aus den Salmycinen A, B bzw. C ist besonders vorteilhaft gegenüber bekannten Verfahren, da die Produkte in größeren Mengen zugänglich sind und die Gewinnung besonders wirtschaftlich erfolgen kann. Danoxamin konnte bisher nicht technisch verwendet werden, da es bisher nur in sehr geringen Mengen aus dem schwer zugänglichen Danomycin hergestellt werden konnte. Außerdem können die Produkte erfindungsgemäß in hoher Reinheit erhalten werden.

Zum Gegenstand der vorliegenden Erfindung gehört weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Desferri-Danoxamin aus Salmycin A und/oder B und Desferri-Nordanoxamin aus Salmycin C durch Hydrolyse und Behandlung mit anderen Komplexbildnern oder durch Reduktion des gebundenen Fe<sup>3+</sup>-Ions. Die auf diese Weise gewonnenen Verbindungen sind sehr wirksam in der Bindung der freien Ionen Fe<sup>3+</sup> und Al<sup>3+</sup>. Man erhält auf diese Weise das bereits beschriebene Desferri-Danoxamin (P. Huber et al., Helv. Chim. Acta 69 (1986) 236—245) und das bisher nicht bekannte Desferri-Nordanoxamin, das die Summenformel C<sub>26</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub> und ein Molekulargewicht 605 g/mol hat.

Zur Herstellung der eisenfreien Formen Desferri-Danoxamin oder Desferri-Nordanoxamin kann auch auf eine Isolierung von Danoxamin und Nordanoxamin verzichtet werden. Der Reaktionsansatz kann nach erfolgter Hydrolyse direkt zur Entfernung des gebundenen Eisens mit einem Komplexbildner, einem eisenbindenden Reagenz oder einem Reduktionsmittel versetzt werden oder einer kathodischen Reduktion unterzogen werden. Als Komplexbildner eignen sich alle gebräuchlichen Komplexierungsmittels, die in der Lage sind, Eisen-III-Ionen zu binden, wie z. B. Ethyldiamintetraessigsäure oder 8-Hydroxychinolin. Schwefelwasserstoff ist ein Beispiel für ein eisenbindendes Reagenz. Als Reduktionsmittel können dienen z. B. Natrium-Thiosulfat, Natriumsulfit oder Hydrochinon. Eine kathodische Reduktion erfolgt vorzugsweise in geteilter Zelle mit einer Kathode aus Platin, Nickel, Stahl, Graphit, Glaskohlenstoff oder anderen üblichen Kathodenmaterialien.

Weiterhin gehört zum Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Desferri-Salmycin A, Desferri-Salmycin B und Desferri-Salmycin C durch Behandlung von Salmycin A, B oder C mit komplexierenden oder eisenbindenden Reagenzien oder durch Reduktion des gebundenen Fe<sup>3+</sup>-Ions. Die bevorzugten Herstellungsbedingungen sind bereits oben für die Herstellung von Desferri-Danoxamin und Desferri-Nordanoxamin beschrieben.

Die eisenfreien Verbindungen Desferri-Danoxamin, Desferri-Nordanoxamin, Desferri-Salmycin A, Desferri-Salmycin B und Desferri-Salmycin C dienen als Chelatoren von dreiwertigen Metallionen, insbesondere der Metallionen Fe<sup>3+</sup> und Al<sup>3+</sup>. Aufgrund dieser Eigenschaften gibt es für diese Verbindungen vielfältige technische Verwendungen. Besondere Bedeutung haben sie in der Pharmazie. In vivo verabreicht nehmen diese Chelatoren im Organismus Fe<sup>3+</sup> und Al<sup>3+</sup> auf und fördern damit die Ausscheidung dieser Ionen. Dadurch stellen sie wertvolle Arzneimittel dar, die insbesondere bei der Hämochromatose, einer Eisenspeicherkrankheit mit zu hohen Fe<sup>3+</sup>-Konzentrationen, oder bei der Alzheimerschen Krankheit mit zu hohen Al<sup>3+</sup>-Konzentrationen mit Erfolg eingesetzt werden können. Gegenüber Desferrioxamin B (s. B.E. Roggo u. H. H. Peter, J. Antibiotics 46 (1993) 294—299), das als Arzneimittel bereits auf dem Markt ist (Desferal), weisen Desferri-Danoxamin und Desferri-Nordanoxamin keine eingeschränkte Verträglichkeit auf und sind selbst in hohen Dosen untoxisch. Desferri-Salmycin A, B und C haben ähnliche Eigenschaften. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Verwendung von Desferri-Danoxamin, Desferri-Nordanoxamin, Desferri-Salmycin A, B und C sowie deren physiologisch verträgliche Salze, wie z. B. Lithium-, Natrium-, Kalium-, Calcium- oder Ammoniumsalz als Arzneimittel.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können ein oder mehrere der aufgeführten Chelatoren und einen oder mehrere Träger- oder Hilfsstoffen wie zum Beispiel Füllmittel, Emulgatoren, Gleitmittel, Geschmacksstoffe, Farbstoffe oder Puffersubstanzen enthalten und können in einer geeigneten pharmazeutischen Form wie beispielsweise Tabletten, Kapseln, eine Suspension oder Lösung parenteral verabreicht werden.

Beispiele für Trägerstoffe sind Tragacanth, Laktose, Talk, Agar-Agar, Polyglykole, Hydrokolloide, Ethanol oder Wasser. Geeignet und bevorzugt für eine parenterale Verabreichung sind z. B. Suspensionen oder Lösungen in Wasser. Es ist ebenfalls möglich, die aktive Substanz ohne Zusatzstoffe in geeigneter Form wie Kapseln zu verabreichen.

### Beispiele

#### Beispiel 1: Anzucht von *Streptomyces violaceus*

*Streptomyces violaceus* (DSM 8286) wird auf folgendem festen Nährboden gehalten:

Stärke:	10 g/l
Casein:	1 g/l
Pepton:	1 g/l
Hefeextrakt:	1 g/l
Malzextrakt:	10 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	0,5 g/l
Agar:	15 g/l

Das Medium wird für 30 Minuten bei 121°C sterilisiert, auf 45°C gekühlt und in Petrischalen abgefüllt. Die Petrischalen werden mit einer Sporensuspension beimpft und 8 Tage bei 28°C bebrütet. Die Lagerung erfolgt bei 4°C. 1 cm<sup>2</sup> einer bebrüteten Platte dient als Inokulum von 500 ml Vorkultur folgender Zusammensetzung:

Glucose:	15 g/l
Sojamehl:	15 g/l
Cornsteep, fl.:	5 ml/l
CaCO <sub>3</sub> :	2 g/l
NaCl:	5 g/l

pH 7,2

Die Inkubation erfolgt für 2 Tage bei 28°C auf einem Rotationsschüttelgerät bei einer Schüttelfrequenz von 240 Upm. 25 ml der Vorkultur dienen als Inokulum einer Hauptkultur (50 ml/ 300 ml Erlenmeyerkolben) folgender Zusammensetzung:

Sojamehl:	20 g/l
Mannit:	20 g/l

pH 7,5

Die Hauptkultur wird 3—4 Tage bei 28°C und 240 Upm bebrütet. Nach dieser Zeit wird im Diffusionstest eine biologische Aktivität von 21—23 mm Hemmhofdurchmesser gegen *Staphylococcus aureus* 209 P festgestellt.

#### Beispiel 2: Produktion der Salmycine A, B und C im Fermenter

Analog Beispiel 1 erfolgt Stammhaltung und Vorkulturanzucht von *Streptomyces violaceus* (DSM 8286). Die Hauptkultur erfolgt in einem 12 l-Fermenter mit 9 l Hauptkulturnährösung aus Beispiel 1. Das Inokulum beträgt 1% des Fermentervolumens. Die Bebrütung erfolgt für 2—3 Tage bei 28°C, 500 Upm und einer Belüftungsrate von 0,5 l/min.

Im Durchschnitt werden biologische Aktivitäten von 22—27 mm Hemmhof gegen *Staphylococcus aureus* 209 P erzielt.

#### Beispiel 3: Isolierung von Roh-Salmycin

180 l Filtrat der nach Beispiel 2 gewonnenen Kulturen werden auf pH 6,8 eingestellt und auf eine mit 17 l eines Adsorptionsharzes gefüllte Säule aufgetragen. Als Adsorbens wird ein Styrol/Divinylbenzol-Copolymer in Pulverform wie Diaion HP-20 (Mitsubishi Chem. Ind., Japan) bevorzugt verwendet. Danach wäscht man den beladenen Träger mit entsalztem Wasser. Der Salmycin-Komplex wird nun mit einem 0-20 Vol.-% Isopropanol enthaltenen Gradienten eluiert. Fraktionen werden gesammelt und auf antibakterielle Wirksamkeit untersucht.

Die Salmycin-haltigen Fraktionen werden vereinigt (ca. 30 l insgesamt). Die Flüssigkeit wird zur Entfernung von sauren Verunreinigungen über eine Anionenaustauscher-Säule (z. B. 1 l Diethylaminoethyl-Sepharose wie DEAE® Sephadex Fast Flow-Ionenaustauscher von Pharmacia Fine Chemicals AB, Schweden) filtriert, die vorher mit Ammoniumacetat-Lösung, pH 7,0, äquilibriert worden ist. Anschließend wird die Lösung durch Ultrafiltration mit einer semipermeablen und permselektiven Membran wie z. B. einer "Nadir UF-CA-1"-Membran (Hoechst; Frankfurt, Deutschland) konzentriert und gefriergetrocknet. Es resultieren 38 g des Salmycin-Rohproduktes.

#### Beispiel 4: Vor-Trennung des Rohproduktgemisches

35 g des nach Beispiel 3 gewonnenen Rohproduktgemisches werden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst und auf eine 3,5 l fassende Säule (11,3 cm innerer Durchmesser, 36 cm Höhe) aufgegeben, die mit einem Adsorbens auf Styrol/Divinylbenzol-Copolymer-Basis wie z. B. "MCI GEL CHP 20 P" (Mitsubishi Kasei Corp., Tokyo, Japan) gepackt ist. Es wird mit Wasser nachgewaschen und mit einem Wasser/10 Vol.-% Isopropanol in Wasser-Gradienten eluiert. Fraktioniert wird literweise. Fraktionen mit Salmycin B und C und Fraktionen, die hauptsächlich Salmycin A enthalten, werden erhalten. Konzentrierung im Vakuum und Gefrieretrocknung ergeben 3,2 g Rohgemisch von Salmycin B und C sowie 1,4 g Roh-Salmycin A.

## Beispiel 5: Reinigung des Salmycin B und C

Das nach Beispiel 4 erhaltene Rohgemisch von Salmycin B und C wird über eine mit Molekularsieb gefüllte Säule (10 cm innerer Durchmesser, 52 cm Höhe) gegeben. Die Säulenpackung besteht z. B. aus 4 l <sup>®</sup>Fractogel TSK HW-40 F (E. Merck, Darmstadt, Deutschland), einem hydrophilen Vinyl-Polymer für die Gelpermeationschromatographie für die Trennung von niedermolekularen Verbindungen wie Dextranen im Molekulargewichtsbereich 100–7000 g/mol. Als Fließmittel dient ein Gemisch aus Wasser und Methanol (1 : 1) mit einem Zusatz von 1 Vol.-% Essigsäure. Fraktionen, die Salmycin B oder C enthalten, werden vereinigt und gefriergetrocknet. Man erhält 510 mg eines Rohprodukts, das 82 Gew.- % Salmycin B und 3 Gew.-% Salmycin C enthält.

5

10

## Beispiel 6: Reinigung des Salmycin A

1,4 g Roh-Salmycin A werden mittels einer mit Molekularsieb gefüllten Säule gereinigt, wie in Beispiel 5 beschrieben. Das Fließmittel besteht aus vier Teilen Wasser und einem Teil Ethanol. Die Fraktionen, die Salmycin A enthalten, werden vereinigt. Konzentrierung und Gefriergetrocknung ergeben 240 mg eines Rohproduktes mit 85 Gew.-% Salmycin A.

15

15

## Beispiel 7: Reingewinnung des Salmycin A

Das nach Beispiel 6 gewonnene Salmycin A (240 mg) wird in destilliertem Wasser gelöst und durch Umkehrphasen-Chromatographie gereinigt. Eine Säule mit 3,2 cm innerem Durchmesser und 25 cm Höhe ist mit 200 ml C<sub>18</sub>-Kieselgel wie z. B. <sup>®</sup>Nucleosil 12 C<sub>18</sub>AB (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) gepackt. Als Fließmittel dient ein Wasser-Acetonitril-Gradient (0–10 Vol.-% Acetonitril). 25 ml-Fraktionen werden gesammelt. Fraktionen, die Salmycin A enthalten, werden vereinigt. Konzentrierung und Gefriergetrocknung ergeben 130 mg Produkt mit 99 Gew.- % Salmycin A.

20

25

## Charakterisierung von Salmycin A

## a) Hochauflösende FAB-Massenspektrometrie:

Molekülionen-Peak von M + H<sup>+</sup>: 1053,4050 ± 0,0006 Dalton

30

Masse (berechnet für M + H<sup>+</sup>, monoisotopisch): 1053,4052 DaltonFormel: C<sub>41</sub>H<sub>70</sub>FeN<sub>7</sub>O<sub>21</sub>b) <sup>1</sup>H-NMR: Signal bei 2,8 ppm in D<sub>2</sub>O (N-Methyl-Gruppe), keine weiteren Signale für Methyl-Protonen.

c) UV-vis der wäßrigen Lösung (Phosphat-Puffer, pH 7,0): Endabsorption und breite Absorption um 430 nm (log ε = 3,3).

35

35

## Beispiel 8: Reingewinnung des Salmycin B und C

Das nach Beispiel 5 gewonnene Gemisch aus Salmycin B und C wird wie in Beispiel 7 durch Umkehrphasen-Chromatographie gereinigt. Das Fließmittel besteht aus einem Gemisch von Wasser, 6 Vol.-% Acetonitril und 0,1 Vol.-% Trifluoressigsäure. 402 mg Salmycin B und 8 mg Salmycin C werden erhalten.

40

## Charakterisierung von Salmycin B

## a) Hochauflösende FAB-Massenspektrometrie:

45

Molekülionen-Peak von M + H<sup>+</sup>: 1038.3941 ± 0.0007 DaltonMolekülionen-Peak von M + H<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O: 1056.406 ± 0.001 DaltonMasse berechnet für M + H<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O: 1056.4053 DaltonFormel: C<sub>41</sub>H<sub>69</sub>FeN<sub>6</sub>O<sub>21</sub>b) <sup>1</sup>H-NMR: Signal bei 2,8 ppm in D<sub>2</sub>O (N-Methyl-Gruppe), keine weiteren Signale für Methyl-Protonen.

50

c) UV-vis der wäßrigen Lösung (Phosphat-Puffer, pH 7,0): Endabsorption und breite Absorption um 427 nm (log ε = 3,3).

## Charakterisierung von Salmycin C

55

## a) ESI-Massenspektrometrie (electron spray Ionisation):

Molekülionen-Peak von M + H<sup>+</sup>: 1024.4 DaltonMolekülionen-Peak von M + H<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O: 1042.4 DaltonFormel: C<sub>40</sub>H<sub>67</sub>FeN<sub>6</sub>O<sub>21</sub>b) <sup>1</sup>H-NMR: Signal bei 2,8 ppm in D<sub>2</sub>O (N-Methyl-Gruppe), keine weiteren Signale für Methyl-Protonen.

60

c) UV-vis der wäßrigen Lösung (Phosphat-Puffer, pH 7,0): Endabsorption und breite Absorption um 430 nm (log ε = 3,3).

## Beispiel 9: Gewinnung des Desferridanoxamin-Kaliumsalzes

65

100 mg Salmycin A werden in 20 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit 0,1N Kalilauge tropfenweise auf pH 9,5 eingestellt. Nach 2 Stunden ist die Hydrolyse beendet. Dann setzt man zur Entfernung des gebundenen Eisens aus dem gebildeten Danoxamin 100 mg Ethylen diamin-tetraessigsäure-di-Kaliumsalz hinzu und lässt weitere

2 Stunden stehen. Hierbei wird die anfänglich lachsfarbene Lösung entfärbt. Die Abtrennung und Reinigung des Desferridanoxamin-Kaliumsalzes erfolgt durch Umkehrphasenchromatographie. Es wird eine Säule von 25 cm Höhe und einem inneren Durchmesser von 3,2 cm verwendet, die mit 200 ml C<sub>18</sub>-Kieselgel, z. B. ©Nucleosil 12 C<sub>18</sub> AB (Macherey & Nagel, Düren, BRD), gefüllt ist. Als Fließmittel wird ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril mit einem Konzentrationsgradienten von 0—15 Vol.-% Acetonitril eingesetzt. Die produktähnlichen Fraktionen werden vereinigt und gefriergetrocknet. Es werden 48 mg eines hellbeigen Pulvers gewonnen. Das Produkt hat eine Reinheit von 98%.

#### Beispiel 10: Gewinnung des Desferri-Nordanoxamin-Natriumsalzes

10 100 mg Salmycin C werden entsprechend Beispiel 9 mit 0,1 N Natronlauge hydrolysiert und mit Ethylendiamin-tetraessigsäure-di-Natriumsalz behandelt. Nach anschließender Reinigung resultieren 45 mg Desferri-Nordanoxamin in 97%iger Reinheit.

#### Beispiel 11: Gewinnung von Desferri-Salmycin A, B oder C

15 100 mg Salmycin A, B oder C werden in Phosphatpuffer, pH 7, gelöst. Dann setzt man zur Entfernung des gebundenen Eisens 100 mg Ethylendiamin-tetraessigsäure-di-Kaliumsalz hinzu und läßt 2 Stunden stehen. Hierbei wird die anfänglich lachsfarbene Lösung entfärbt. Die Abtrennung und Reinigung des Desferri-Salmycins erfolgt durch Umkehrphasenchromatographie. Es wird eine Säule von 25 cm Höhe und einem inneren Durchmesser von 3,2 cm verwendet, die mit 200 ml C<sub>18</sub>-Kieselgel, z. B. ©Nucleosil 12 C<sub>18</sub> AB (Macherey & Nagel, Düren, BRD), gefüllt ist. Als Fließmittel wird ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril mit einem Konzentrationsgradienten von 0—15 Vol.-% Acetonitril eingesetzt. Die produktähnlichen Fraktionen werden vereinigt und gefriergetrocknet. Es wird ein hellbeiges Pulver gewonnen. Das Produkt hat eine hohe Reinheit.

#### Patentansprüche

- 25 1. Verbindung mit der Summenformel C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>FeN<sub>5</sub>O<sub>11</sub> mit einem Molekulargewicht von 658 g/mol, genannt Nordanoxamin, sowie dessen eisenfreie Form mit der Summenformel C<sub>26</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub> und einem Molekulargewicht 605 g/mol, genannt Desferri-Nordanoxamin; Verbindungen der Summenformel C<sub>41</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>21</sub>, genannt Desferri-Salmycin A, Molekulargewicht 1000 g/mol, der Summenformel C<sub>41</sub>H<sub>72</sub>N<sub>6</sub>O<sub>21</sub>, genannt Desferri-Salmycin B, Molekulargewicht 985 g/mol, der Summenformel C<sub>40</sub>H<sub>70</sub>N<sub>6</sub>O<sub>21</sub>, genannt Desferri-Salmycin C, Molekulargewicht 971 g/mol.
- 30 2. Verfahren zur Herstellung von Nordanoxamin gemäß Anspruch 1 durch Hydrolyse von Salmycin C.
- 35 3. Verfahren zur Herstellung von Danoxamin mit der Summenformel C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>FeN<sub>5</sub>O<sub>11</sub> und einem Molekulargewicht von 672 g/mol durch Hydrolyse von Salmycin A und/oder B.
- 40 4. Verfahren zur Herstellung von Desferri-Nordanoxamin gemäß Anspruch 1 aus Salmycin C durch Hydrolyse und Behandlung mit komplexierenden oder eisenbindenden Reagenzien oder durch Reduktion des gebundenen Fe<sup>3+</sup>-Ions.
- 45 5. Verfahren zur Herstellung von Desferri-Danoxamin aus Salmycin A und/oder B durch Hydrolyse und Behandlung mit komplexierenden oder eisenbindenden Reagenzien oder durch Reduktion des gebundenen Fe<sup>3+</sup>-Ions.
- 50 6. Verfahren zur Herstellung von Desferri-Salmycin A, Desferri-Salmycin B und Desferri-Salmycin C gemäß Anspruch 1 durch Behandlung von Salmycin A, B oder C mit komplexierenden oder eisenbindenden Reagenzien oder durch Reduktion des gebundenen Fe<sup>3+</sup>-Ions.
- 55 7. Arzneimittel enthaltend eine oder mehrere der Verbindungen Desferri-Nordanoxamin gemäß Anspruch 4, Desferri-Danoxamin gemäß Anspruch 5, Desferri-Salmycin A, Desferri-Salmycin B und Desferri-Salmycin C gemäß Anspruch 6.
- 60 8. Verwendung der Verbindungen Desferri-Nordanoxamin gemäß Anspruch 4, Desferri-Danoxamin gemäß Anspruch 5, Desferri-Salmycin A, Desferri-Salmycin B oder Desferri-Salmycin C gemäß Anspruch 6 als Chelatoren, bevorzugt zur Bindung der Metallionen Fe<sup>3+</sup> und Al<sup>3+</sup>.
- 65 9. Verwendung der Verbindungen Desferri-Nordanoxamin gemäß Anspruch 4, Desferri-Danoxamin gemäß Anspruch 5, Desferri-Salmycin A, Desferri-Salmycin B oder Desferri-Salmycin C gemäß Anspruch 6 und deren physiologisch verträgliche Salze zur Anwendung als Arzneimittel.
- 70 10. Verwendung der Verbindungen Desferri-Nordanoxamin gemäß Anspruch 4, Desferri-Danoxamin gemäß Anspruch 5, Desferri-Salmycin A, Desferri-Salmycin B oder Desferri-Salmycin C gemäß Anspruch 6 und deren physiologisch verträgliche Salze zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Hämochromatose oder Alzheimer'scher Krankheit.